

## ピリキュロールの生成条件について

佐 藤 善 司（北陸農業試験場）

Z. SATO : Studies on production of pyriculol by rice blast fungus, *Pyricularia oryzae*

前報<sup>1)</sup>において、著者はイネいもち病菌の生産する毒物質ピリキュロールの定量法について報告した。この定量法を用いて各種培養条件下におけるピリキュロールの生成及び病原性の異なる多数のイネいもち病菌々株のピリキュロール生成量の差異について検討した結果を報告する。

実験の一部について御助力いただいた現福井県農業改良普及員宮越盈氏に深謝する。

なお、本実験は著者が農業技術研究所在任中に行ったものであり、その一部は既に日本植物病理学会大会で口頭発表した<sup>2)</sup>。

### I 実験方法

1 供試菌株 研53—33菌。

2 培地組成 イースト培地：粉末酵母エキス（大五栄養化学製）5 g, グルコース20 g, リン酸一カリウム0.5 g, リン酸二カリウム0.5 g, 硫酸マグネシウム7水塩0.5 g, 塩化カルシウム2水塩0.1 g/l。ジャガイモ培地：ジャガイモ200 gをジューサーにかけ、遠心分離（5,000rpm, 10min）した上清を100°Cで10min 加熱して、生じた沈でん物をろ過又は遠心分離で除去する。このジャガイモ汁に上記イースト培地の粉末酵母エキス以外の成分を加えて蒸溜水で1 lとする。合成培地：柄内・中野培地。ペプトン培地：イースト培地の粉末酵母エキスの代わりにポリペプトン（大五栄養化学製）5 gとし、他の成分はイースト培地と同様。

3 培地のpHの調整 培地をオートクレーブで殺菌した後、稀塩酸又は稀水酸化ナトリウムで無菌的に培地のpHを所定通り調整した。

4 培養条件 各液体培地を500ml容の坂口フラスコに100mlずつ分注し、オートクレーブで120°C, 20min殺菌した後、ニクロム線環で径2 mmに打ち抜いた前培養の菌体を接種して、28°Cで8日間振とう培養した。

5 菌体生育量 吸引ろ過によって培養ろ液を除去し、ろ紙上の菌体を50mlの蒸溜水で3回洗浄し、70°Cで恒量になるまで菌体を乾燥して乾燥重を測定した。

6 ピリキュロールの定量法 前報<sup>1)</sup>による。

### II 実験結果及び考密

1 培地の種類とピリキュロール生成量 第1表に示したように、ピリキュロール生成量は培地の種類によってかなり異なる。菌体の生育量はイースト>ジャガイモ>合成>ペプトン各培地の順であるが、ピリキュロール生成量はジャガイモ>イースト>合成各培地の順に多く、ペプトン培地ではほとんど生成されなかった。

第1表 培地の種類とピリキュロール生成量

培地	ピリキュロール (μg/培養3液100ml)	乾燥菌体重 (mg/フラスコ)
イースト培地	1365.5*	908.5
ジャガイモ培地	2278.8	357.0
合成培地	483.7	143.0
ペプトン培地	0	60.0

\* 各区3フラスコの培養3液を合わせ、その50mlをとり6回分析した平均値。

2 培地の窒素源・炭素源濃度とピリキュロール生成量 イースト培地を用いて、窒素源（粉末酵母エキス）と炭素源（グルコース）の濃度を変えてピリキュロール生成量を調べた結果（第2表）、窒素源と炭素源の濃度によってピリキュロール生成量は大きく変動し、粉末酵母エキス5 g, グルコース10 g/lの場合に最も生成量が多かった。

第2表 培地の窒素源・炭素源濃度と  
ピリキュロール生成量

		粉末酵母エキス(g/l)		
		1	5	10
グ	10	1901.8*	649.2	0
ル	20	1895.7	2940.7	303.6
コ	30	284.6	1419.9	549.3

\* ピリキュロールμg/培養3液100ml。各区3フラスコの培養3液を合わせ、その50mlをとり3回分析した平均値。

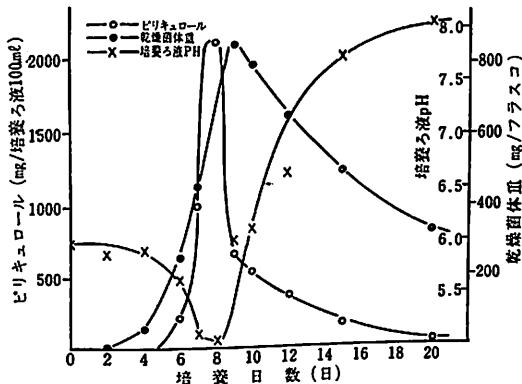
3 培地のpHとピリキュロール生成量 イースト培地を殺菌後、無菌的に所定の各pHに調整し、菌を培

差してピリキュロール生成量を調べた結果（第3表），培地のpHが高い場合には菌体の生育量がやや低下するが，ピリキュロール生成量はpH 9.0で最も多く，pH 5.0以下では極めて少なかった。

第3表 イースト培地のpHとピリキュロール生成量

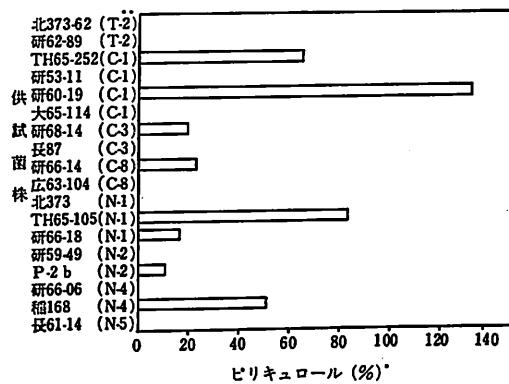
培養前pH	培養後pH	ピリキュロール ( $\mu\text{g}/\text{培養3液}$ 100mL)	乾燥菌体重 (mg/フラスコ)
4.00	3.60	32.9*	760.9
5.00	5.28	98.6	781.6
6.10	5.90	2130.0	677.5
7.00	6.30	1977.9	783.5
8.10	6.90	2232.9	651.8
9.00	6.83	3294.0	557.3
10.00	6.53	989.3	531.2

\* 各区3フラスコの培養液を合わせ、その50mLをとり6回分析した平均値。

第1図 培養日数とピリキュロール生成量  
(イースト培地)

4 培養日数とピリキュロール生成量 イースト培地を用い、培養日数とピリキュロール生成量との関係を調べた結果を第1図に示す。菌体の生育は6日目頃から盛んになり、菌体重は9日目でほぼ最高に達し、以後次第に減少する。ピリキュロール生成量は6日目まで極めて少量であるが、菌体の生育と共に増加し、8日目前後で最高に達し、以後急激に減少する。菌体の生育の対数期にピリキュロール生成量が最も多くなる傾向を示した。培養前の培地のpHに6.0前後であるが、菌体の生育と共にpHは低下し、8日目で最低(pH 5.05)となり、以後徐々に高くなり、20日目で最高(pH 8.05)となる。

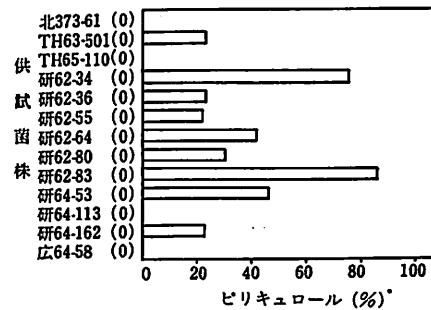
5 病原性の異なる各種菌株のピリキュロール生成量 病原性の異なる18菌株と孢子を形成するが病原性がない13菌株の計31菌株を供試し、イースト培地を用いて各供試菌株のピリキュロール生成量と対照菌株とした研53-33菌の生成量との比率を第2、3図に示した。なお、実



\* 標準菌株研53-33菌(T-1)の生成量に対する比率。各菌とも3フラスコの培養液を合わせ、その50mLをとり3~6回分析した平均値。イースト培地。

\*\* 旧レース名。

第2図 各種イネいもち病菌々株のピリキュロール生成量(1)



\* 標準菌株研53-33菌(T-1)の生成量に対する比率。各菌とも3フラスコの培養液を合わせ、その50mLをとり3~6回分析した平均値。イースト培地。

\*\* 旧レース名。

第3図 各種イネいもち病菌々株のピリキュロール生成量(2)

験前にイネ幼苗噴霧接種法ですべての供試菌株の病原性を再確認した。各供試菌株の乾燥菌体重は985.3~580.3 mg/フラスコの範囲内であったが、ピリキュロール生成量は菌株によってかなり差異があり、最も生成量が多かった菌株は研60-19菌であった。病原性のない菌株の中、研62-83、研62-34菌はかなり多くのピリキュロールを生成するが、病原性のある菌株でも北373-62菌の外9菌株はほとんどピリキュロールを生成せず、病原性の差異又は病原性の有無とピリキュロール生成量との間に関連性は認められなかった。

Bousquet (1973)<sup>11</sup>はピリキュロール生成量とウイルスをもつ菌株との間には正の相関関係があると報告しているが、ピリキュロール生成量が比較的多い研60-19、TH65-105菌はいずれもウイルスをもっていることが Yamashita et al. (1971)<sup>12</sup>によって確認されており、

イネいもち病菌ウイルスとピリキュロール生成との関係について興味がもたれる。

### III 摘 要

イネいもち病菌の生産する毒性物質ピリキュロールの生成条件について検討した結果、ピリキュロール生成量は培地の種類、窒素源・炭素源濃度、培地の pH、培養日数などの培養条件によって大きく変動することが判明した。又病原性の異なる多数の菌株を供試してピリキュロール生成量を調べた結果、イネいもち病菌の病原性とピリキュロール生成量との間に直接的な関連性は認められなかった。

### 引 用 文 献

- 1) Bousquet, J.-F. (1973) Variation du taux de production de pyriculol dans les filtrats de culture de souches saines ou virosées de *Pyricularia oryzae* CAV. Ann. Phytopathol. 5 : 285—288.
- 2) 佐藤善司・宮宮越盈 (1974) ピリキュロールの定量法および生成条件について(講要). 日植病報40 : 174.
- 3) 佐藤善司 (1978) ガスクロマトグラフィーによるイネいもち病菌培養液中のピリキュロールの定量法. 北陸病虫研報26 : 88~90.
- 4) Yamashita, S., Doi, Y. and Yora, K. (1971) A polyhedral virus found in rice blast fungus, *Pyricularia oryzae* CAVARA. 日植病報37 : 356—359.

(1978年8月14日受領)

## ガスクロマトグラフィーによるイネいもち病菌培養液中のピリキュロールの定量法

佐 藤 善 司 (北陸農業試験場)

Z. SATO : Gas chromatographic determination of pyriculol in culture filtrates of rice blast fungus, *Pyricularia oryzae*

Iwasaki et al. (1969)<sup>1)</sup> はイネいもち病菌の生産する毒性物質として、培養液からピリキュロールを単離し、その化学構造を明らかにした。著者はいもち病菌培養液中のピリキュロールの微量定量法について検討したので、その結果を報告する。

なお、本実験は著者が農業技術研究所在任中に行ったものであり、その一部は既に日本植物病理学会大会で口頭発表した<sup>2)</sup>。

### I 実 験 方 法

1 ガスクロマトグラフィーの条件 ガスクロマトグラフ：水素炎イオン化検出器 (FID) 付島津GC-5A型。分離管：内径3 mm, 長さ1 m, ガラス製カラム。充てん剤：1.5% OV-17/クロモソープW AW-DMCS, 60~80メッシュ。分離管温度：180°C。試料気化室温度：220°C。キャリヤーガス窒素流量：60ml/min。水素流量：50ml/min。空気流量：1.0l/min。検出器感度：10<sup>2</sup>MΩ, 0.16V。記録紙送り速度：10mm/min。

2 検量線の作成 ピリキュロール 6 mg をアセトン20mlに溶解し、その一定量を取り減圧下でアセトンを留去する。内部標準物質として2, 3-ジケトインドリンの0.1%アセトン溶液 0.5ml を試料に加えて溶解する。マイクロシリンジでその1μlを取り、ガスクロマトグラフに注入する。得られたガスクロマトグラムからピーク高又は半値幅法による面積を測定してピーク高比又は面積比を求め、重量比に対する検量線を作成した。

3 試料の調製 供試菌は研53-33。イースト培地(グルコース20g, 粉末酵母エキス5g, リン酸一カリウム0.5g, リン酸二カリウム0.5g, 硫酸マグネシウム7水塩0.5g, 塩化カルシウム2水塩0.1g/l)で28°C, 8日間振とう培養後、吸引ろ過により菌体を除去し、ろ液50mlを取る。稀塩酸でpHを5.5に調整後分液ローラに移し、同量のエチルエーテルで3回抽出し、無水硫酸ナトリウムで脱水する。エチルエーテルを留去した後、メルク社製シリカゲルHを用いて薄層クロマトグラフィーを行う。展開溶媒はベンゼン：アセトン(3:1), 展開距離は10cm。展開後直ちに近紫外線(365nm)を